

WHAT IS CLAIMED IS:

1. N-グリコシド結合複合型糖鎖を Fc 領域に有する抗体分子からなる組成物であって、該組成物中に含まれる Fc 領域に結合する全 N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合が 20%以上である抗体組成物を生産する、抗体分子をコードする遺伝子を導入したチャイニーズハムスター卵巣組織由来の CHO 細胞。

2. フコースが結合していない糖鎖が、該フコースの 1 位が N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位に α 結合していない糖鎖である、請求の範囲 1 に記載の CHO 細胞。

3. 抗体分子のクラスが IgG である、請求の範囲 1 または 2 項に記載の CHO 細胞。

4. 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素の活性または N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性が低下または欠失した請求の範囲 1~3 のいずれか 1 項に記載の CHO 細胞。

5. 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素が、以下の (a)、(b) 及び (c) からなる群から選ばれる酵素である、請求の範囲 4 に記載の CHO 細胞。

(a) GMD (GDP-mannose 4,6-dehydratase) ;

(b) Fx (GDP-keto-6-deoxymannose 3,5-epimerase, 4-reductase) ;

(c) GFPP (GDP-beta-L-fucose pyrophosphorylase)。

6. GMD が、以下の (a) または (b) である DNA がコードする蛋白質である、請求の範囲 5 に記載の CHO 細胞。

(a) 配列番号 65 で表される塩基配列からなる DNA ;

(b) 配列番号 65 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ GMD 活性を有する蛋白質をコードする DNA。

7. GMD が、以下の (a)、(b) 及び (c) からなる群から選ばれる蛋白質である、請求の範囲 5 に記載の CHO 細胞。

(a) 配列番号 71 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質 ;

(b) 配列番号 71 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ GMD 活性を有する蛋白質。

(c) 配列番号 71 で表されるアミノ酸配列と 80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ GMD 活性を有する蛋白質。

8. Fx が、以下の (a) または (b) である DNA がコードする蛋白質である、請求の範囲 5 に記載の CHO 細胞。

(a) 配列番号 48 で表される塩基配列からなる DNA ;

(b) 配列番号 48 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ Fx 活性を有する蛋白質をコードする DNA。

9. Fx が、以下の (a)、(b) 及び (c) からなる群から選ばれる蛋白質である、請求の範囲 5 に記載の CHO 細胞。

(a) 配列番号 72 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質 ;

(b) 配列番号 72 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ Fx 活性を有する蛋白質；

(c) 配列番号 72 で表されるアミノ酸配列と 80 %以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ Fx 活性を有する蛋白質。

10. GFPP が、以下の (a) または (b) である DNA がコードする蛋白質である、請求の範囲 5 に記載の CHO 細胞。

(a) 配列番号 51 で表される塩基配列からなる DNA；

(b) 配列番号 51 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ GFPP 活性を有する蛋白質をコードする DNA。

11. GFPP が、以下の (a)、(b) 及び (c) からなる群から選ばれる蛋白質である、請求の範囲 5 に記載の CHO 細胞。

(a) 配列番号 73 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；

(b) 配列番号 73 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ GFPP 活性を有する蛋白質；

(c) 配列番号 73 で表されるアミノ酸配列と 80 %以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ GFPP 活性を有する蛋白質。

12. N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素が α -1,6-フコシルトランスフェラーゼである、請求の範囲 4 に記載の CHO 細胞。

13. α -1,6-フコシルトランスフェラーゼが、以下の (a) または (b) である DNA がコードする蛋白質である、請求の範囲 12 に記載の CHO 細胞。

(a) 配列番号 1 で表される塩基配列からなる DNA；

(b) 配列番号 1 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードする DNA。

14. α -1,6-フコシルトランスフェラーゼが、以下の (a)、(b) 及び (c) からなる群から選ばれる蛋白質である、請求の範囲 12 に記載の CHO 細胞。

(a) 配列番号 23 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；

(b) 配列番号 23 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質；

(c) 配列番号 23 で表されるアミノ酸配列と 80 %以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質。

15. 酵素の活性が、以下の (a)、(b)、(c)、(d) 及び (e) からなる群から選ばれる手法により低下または欠失した、請求の範囲 4~14 のいずれか 1 項に記載の CHO 細胞。

(a) 酵素の遺伝子を標的した遺伝子破壊の手法；

(b) 酵素の遺伝子のドミナントネガティブ体を導入する手法；

(c) 酵素についての突然変異を導入する手法；

(d) 酵素の遺伝子の転写又は翻訳を抑制する手法；

(e) N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が

α 結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性である株を選択する手法。

16. 少なくとも N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が α 結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性である、請求の範囲 4~15 のいずれか 1 項に記載の CHO 細胞。

17. 親株である CHO 細胞が生産する抗体組成物より、抗体依存性細胞障害活性が高い抗体組成物を生産する、請求の範囲 4~16 のいずれか 1 項に記載の CHO 細胞。

18. 抗体組成物中に含まれる Fc 領域に結合する全 N-グリコシド結合複合型糖鎖のうち、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンとフコースが結合していない糖鎖の割合が 20%未満である抗体組成物よりも抗体依存性細胞障害活性が高い抗体組成物を生産する、請求の範囲 17 記載の CHO 細胞。

19. フコースが結合していない糖鎖が、該フコースの 1 位が N-グリコシド結合複合型糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位に α 結合していない糖鎖である、請求の範囲 18 記載の CHO 細胞。

20. 請求の範囲 1~19 のいずれか 1 項に記載の CHO 細胞を培地に培養し、培養物中に抗体組成物を生成蓄積させ、該培養物から抗体組成物を採取する工程を含む、抗体組成物を製造する方法。

21. 請求の範囲 20 に記載の方法を用いて製造される抗体組成物。

22. CHO 細胞が産生する N-グリコシド結合複合型糖鎖を Fc 領域に有する抗体分子からなる組成物であって、該組成物中に含まれる Fc 領域に結合する全 N-グリコシド結合糖鎖のうち、糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合が 20%以上である抗体組成物。

23. 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素の活性または N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性が遺伝子工学的な手法により低下または欠失した細胞。

24. 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素が、以下の (a)、(b) 及び (c) からなる群から選ばれる酵素である、請求の範囲 23 記載の細胞。

(a) GMD (GDP-mannose 4,6-dehydratase) ;

(b) Fx (GDP-keto-6-deoxymannose 3,5-epimerase, 4-reductase) ;

(c) GFPP (GDP-beta-L-fucose pyrophosphorylase)。

25. GMD が、以下の (a) または (b) である DNA がコードする蛋白質である、請求の範囲 24 に記載の細胞。

(a) 配列番号 65 で表される塩基配列からなる DNA ;

(b) 配列番号 65 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジентな条件でハイブリダイズし、かつ GMD 活性を有する蛋白質をコードする DNA。

26. GMD が、以下の (a)、(b) 及び (c) からなる群から選ばれる蛋白質である、請求の範囲 24 に記載の細胞。

(a) 配列番号 71 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質 ;

(b) 配列番号 71 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ GMD 活性を有する蛋白質。

(c) 配列番号 71 で表されるアミノ酸配列と 80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ GMD 活性を有する蛋白質。

27. Fx が、以下の (a) または (b) である DNA がコードする蛋白質である、請求の範囲 24 に記載の細胞。

(a) 配列番号 48 で表される塩基配列からなる DNA ;

(b) 配列番号 48 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジントな条件でハイブリダイズし、かつ Fx を有する蛋白質をコードする DNA。

28. Fx が、以下の (a)、(b) 及び (c) からなる群から選ばれる蛋白質である、請求の範囲 24 に記載の細胞。

(a) 配列番号 72 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質 ;

(b) 配列番号 72 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ Fx 活性を有する蛋白質 ;

(c) 配列番号 72 で表されるアミノ酸配列と 80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ Fx 活性を有する蛋白質。

29. GFPP が、以下の (a) または (b) である DNA がコードする蛋白質である、請求の範囲 24 に記載の細胞。

(a) 配列番号 51 で表される塩基配列からなる DNA ;

(b) 配列番号 51 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジントな条件でハイブリダイズし、かつ GFPP 活性を有する蛋白質をコードする DNA。

30. GFPP が、以下の (a)、(b) 及び (c) からなる群から選ばれる蛋白質である、請求の範囲 24 に記載の細胞。

(a) 配列番号 73 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質 ;

(b) 配列番号 73 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ GFPP 活性を有する蛋白質 ;

(c) 配列番号 73 で表されるアミノ酸配列と 80%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ GFPP 活性を有する蛋白質。

31. N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素が α -1,6-フコシルトランスフェラーゼである、請求の範囲 23 に記載の細胞。

32. α -1,6-フコシルトランスフェラーゼが、以下の (a)、(b)、(c) 及び (d) からなる群から選ばれる DNA がコードする蛋白質である、請求の範囲 31 に記載の細胞。

(a) 配列番号 1 で表される塩基配列からなる DNA ;

(b) 配列番号 2 で表される塩基配列からなる DNA ;

(c) 配列番号 1 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジントな条件でハイブリダイズし、かつ α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードする DNA ;

(d) 配列番号 2 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジントな条件でハイブリダイズし、かつ α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードする DNA。

33. α -1,6-フコシルトランスフェラーゼが、以下の (a)、(b)、(c)、(d)、(e) 及び (f) からなる群から選ばれる蛋白質である、請求の範囲 31 に記載の細胞。

- (a) 配列番号 23 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；
(b) 配列番号 24 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質；
(c) 配列番号 23 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質；
(d) 配列番号 24 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質；
(e) 配列番号 23 で表されるアミノ酸配列と 80% 以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質；
(f) 配列番号 24 で表されるアミノ酸配列と 80% 以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質。

34. 遺伝子工学的な手法が、以下の (a)、(b)、(c) 及び (d) からなる群から選ばれる手法である、請求の範囲 23～33 のいずれか 1 項に記載の細胞。

- (a) 酵素の遺伝子を標的した遺伝子破壊の手法；
(b) 酵素の遺伝子のドミナントネガティブ体を導入する手法；
(c) 酵素についての突然変異を導入する手法；
(d) 酵素の遺伝子の転写又は翻訳を抑制する手法。

35. 少なくとも N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位とフコースの 1 位が α 結合した糖鎖構造を認識するレクチンに耐性である、請求の範囲 23～34 のいずれか 1 項に記載の細胞。

36. 請求の範囲 23～35 のいずれか 1 項に記載の細胞が、下記の (a)～(i) からなる群から選ばれる細胞。

- (a) チャイニーズハムスター卵巣組織由来 CHO 細胞；
(b) ラットミエローマ細胞株 YB2/3HL P2.G11.16Ag.20 細胞；
(c) マウスミエローマ細胞株 NS0 細胞；
(d) マウスミエローマ細胞株 SP2/0-Ag14 細胞；
(e) シリアンハムスター腎臓組織由来 BHK 細胞；
(f) 抗体を産生するハイブリドーマ細胞；
(g) ヒト白血病細胞株ナマルバ細胞；
(h) 胚性幹細胞；
(i) 受精卵細胞。

37. 請求の範囲 23～36 のいずれか 1 項に記載の細胞に、抗体分子をコードする遺伝子を導入した細胞。

38. 抗体分子のクラスが IgG である、請求の範囲 37 記載の細胞。

39. 請求の範囲 37 または 38 項に記載の細胞を培地に培養し、培養物中に抗体組成物を生成蓄積させ、該培養物から抗体組成物を採取する工程を含む、抗体組成物の製造方法。

40. 親株から得られる抗体組成物よりも、抗体依存性細胞障害活性が高い抗体組成物を生産する、請求の範囲 39 に記載の方法。

41. 請求の範囲 39 または 40 に記載の方法を用いて製造される、抗体組成物。
42. 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素の活性または N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の活性が低下するように、ゲノムが改変されたトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。
43. 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素の遺伝子または N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素の遺伝子がノックアウトされた、請求の範囲 42 に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。
44. 細胞内糖ヌクレオチド GDP-フコースの合成に関与する酵素が、以下の (a)、(b) 及び (c) からなる群から選ばれる酵素である、請求の範囲 42 または 43 に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。
 - (a) GMD (GDP-mannose 4,6-dehydratase) ;
 - (b) Fx (GDP-keto-6-deoxymannose 3,5-epimerase, 4-reductase) ;
 - (c) GFPP (GDP-beta-L-fucose pyrophosphorylase)。
45. GMD が、以下の (a) または (b) である DNA がコードする蛋白質である、請求の範囲 44 に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。
 - (a) 配列番号 65 で表される塩基配列からなる DNA ;
 - (b) 配列番号 65 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ GMD 活性を有する蛋白質をコードする DNA。
46. Fx が、以下の (a) または (b) である DNA がコードする蛋白質である、請求の範囲 44 に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。
 - (a) 配列番号 48 で表される塩基配列からなる DNA ;
 - (b) 配列番号 48 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ Fx 活性を有する蛋白質をコードする DNA。
47. GFPP が、以下の (a) または (b) である DNA がコードする蛋白質である、請求の範囲 44 に記載の細胞。
 - (a) 配列番号 51 で表される塩基配列からなる DNA ;
 - (b) 配列番号 51 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ GFPP 活性を有する蛋白質をコードする DNA。
48. N-グリコシド結合糖鎖還元末端の N-アセチルグルコサミンの 6 位にフコースの 1 位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素が α -1,6-フコシルトランスフェラーゼである、請求の範囲 42 または 43 に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。
49. α -1,6-フコシルトランスフェラーゼが、以下の (a)、(b)、(c) 及び (d) からなる群から選ばれる DNA がコードする蛋白質である、請求の範囲 48 に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫。
 - (a) 配列番号 1 で表される塩基配列からなる DNA ;
 - (b) 配列番号 2 で表される塩基配列からなる DNA ;
 - (c) 配列番号 1 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダ

イズし、かつ α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードする DNA ;

(d) 配列番号 2 で表される塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質をコードする DNA。

50. トランスジェニック非ヒト動物が、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウマ、マウス、ラット、ニワトリ、サル及びウサギからなる群から選ばれる動物である、請求の範囲 42~49 のいずれか 1 項に記載のトランスジェニック非ヒト動物、またはその子孫。

51. 請求の範囲 42~50 のいずれか 1 項に記載のトランスジェニック非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫に抗体分子をコードする遺伝子を導入し、該動物あるいは植物を飼育し、飼育した動物あるいは植物から導入した抗体を含む組織あるいは体液を取得し、取得した組織あるいは体液から目的とする抗体組成物を採取する工程を含む、抗体組成物を製造する方法。

52. 抗体分子のクラスが IgG である、請求の範囲 51 に記載の方法。

53. ゲノムが改変されていない非ヒト動物あるいは植物、またはその子孫から得られる抗体組成物よりも、抗体依存性細胞障害活性が高い抗体組成物を生産する、請求の範囲 51 または 52 に記載の方法。

54. 請求の範囲 51~53 のいずれか 1 項に記載の方法を用いて製造される、抗体組成物。

55. 請求の範囲 21、22、41 または 54 のいずれか 1 項に記載の抗体組成物を有効成分として含有する医薬。

56. 医薬が、腫瘍を伴う疾患、アレルギーを伴う疾患、炎症を伴う疾患、自己免疫疾患、循環器疾患、ウイルス感染を伴う疾患または細菌感染を伴う疾患に対する診断薬、予防薬又は治療薬である、請求の範囲 55 に記載の医薬。

57. 以下の(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)、(i)及び(j)からなる群から選ばれる蛋白質。

(a) 配列番号 71 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質 ;

(b) 配列番号 71 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ GMD 活性を有する蛋白質 ;

(c) 配列番号 72 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質 ;

(d) 配列番号 72 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ Fx 活性を有する蛋白質 ;

(e) 配列番号 73 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質 ;

(f) 配列番号 73 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ GFPP 活性を有する蛋白質 ;

(g) 配列番号 23 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質 ;

(h) 配列番号 23 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ α -1,6-フコシルトランスフェラーゼ活性を有する蛋白質 ;

(i) 配列番号 24 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質 ;

(j) 配列番号 24 で表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ α -1,6-フコシルトランスフェラー

ぜ活性を有する蛋白質。

58. 請求の範囲 57 記載の蛋白質をコードする DNA。

59. 以下の (a)、(b)、(c)、(d) 及び (e) からなる群から選ばれる DNA。

(a) 配列番号 1 で表される塩基配列を含む DNA ;

(b) 配列番号 2 で表される塩基配列を含む DNA ;

(c) 配列番号 65 で表される塩基配列を含む DNA ;

(d) 配列番号 48 で表される塩基配列を含む DNA ;

(e) 配列番号 51 で表される塩基配列を含む DNA。

60. 以下の (a)、(b) 及び (c) からなる群から選ばれるゲノム DNA。

(a) 配列番号 3 で表される塩基配列を含むゲノム DNA ;

(b) 配列番号 67 で表される塩基配列を含むゲノム DNA ;

(c) 配列番号 70 で表される塩基配列を含むゲノム DNA。

61. 請求の範囲 58~60 のいずれか 1 項に記載の DNA 全長あるいは一部を含む相同組み換えのためのターゲットベクター。